(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号
特許第3261456号
(P3261456)
(45)発行日　平成14年３月４日(2002.3.4)　(24)登録日　平成13年12月21日(2001.12.21)

(51)Int.Cl.⁷	識別記号	Ｆ Ｉ	
Ｃ１２Ｎ　11/10		Ｃ１２Ｎ　11/10	
5/06		5/00	Ｅ

請求項の数７(全　７　頁)

(21)出願番号　特願平11－309684
(22)出願日　平成11年10月29日(1999.10.29)
(65)公開番号　特開2001－120267(P2001－120267A)
(43)公開日　平成13年５月８日(2001.5.8)
審査請求日　平成11年10月29日(1999.10.29)

(73)特許権者　301021533
独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関１－３－１
(72)発明者　原　正之
茨城県つくば市東１丁目１番４　工業技術院　産業技術融合領域研究所内
(72)発明者　三宅　淳
茨城県つくば市東１丁目１番４　工業技術院　産業技術融合領域研究所内
(72)発明者　山木　綾子
茨城県つくば市東１丁目１番４　工業技術院　産業技術融合領域研究所内

審査官　光本　美奈子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞培養担体及び該担体を用いた細胞の培養方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】　多孔質膜と該多孔質膜上に形成されたアルギン酸ゲル層とを含み、シート状を呈することを特徴とする、細胞培養担体。
【請求項２】　前記アルギン酸ゲルがアルギン酸カルシウムゲルであることを特徴とする、請求項１記載の細胞培養担体。
【請求項３】　前記アルギン酸ゲル層上に形成された細胞外マトリックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層をさらに含むことを特徴とする、請求項１又は２記載の細胞培養担体。
【請求項４】　前記細胞外マトリックス成分がコラーゲンであることを特徴とする、請求項３記載の細胞培養担体。
【請求項５】　請求項１～４のいずれかに記載の細胞培養担体を用いて細胞を培養することを特徴とする、細胞の培養方法。

【請求項６】　請求項１～４のいずれかに記載の細胞培養担体上に細胞層を形成してなる細胞培養物を、アルギン酸ゲル層を可溶化処理して前記多孔質膜と細胞層とを剥離し、その後、剥離した細胞層を、請求項１～４のいずれかに記載の細胞培養担体上に細胞層を形成してなる細胞培養物上に重層する細胞の重層化方法。
【請求項７】　請求項６記載の細胞の重層化方法により得られる重層化した細胞層。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】本発明は、細胞培養の技術に関し、具体的には、細胞培養担体、該細胞培養担体を利用した細胞の培養方法、該培養方法により得られる細胞

培養物、該細胞培養物を利用した細胞層の重層化方法、該重層化方法により得られる重層化した細胞層に関する。

【０００２】

【従来の技術】高分子含水ゲルは、生体に類似した構造を持ち、温度、酸性・アルカリ性等の外部条件によって膨張、収縮する性質を有するため、人工筋肉などの人工臓器・組織への応用、内部に薬剤を封入して放出量をコントロールする医療分野への応用のみならず、各種サイトカイン等を含むゲルとして細胞を培養する際に細胞成長の足場としての利用も試みられている。

【０００３】高分子含水ゲルの中でも温度応答性高分子であるN-イソプロピルアクリルアミド（N-isopropylacrylamide）（以下「NIPAM」と称する）は、低温では膨潤して液状であるが、34℃付近で相転移し急激に収縮しゲル化する。従来、培養細胞の階層化を行うに当たり、37℃の温度条件下、ゲル化したNIPAM上で培養した細胞をNIPAMごと別の細胞層に重ね、その後34℃以下に下げることによりNIPAMを液状化させて取り除き、細胞同士を直接重ねるという手法が取られていた。

【０００４】NIPAM上で細胞培養を行った場合、通常、細胞は単層状に成長する。この際、隣り合った細胞同士ではコラーゲン等の細胞外マトリックス（Extracellular Matrix）（以下「ECM」と称する）が形成される。そして、細胞が増殖するためには、ECMに接着する必要がある。しかし、細胞の上部及び細胞と基底層であるNIPAM間は他の細胞と接着しておらず、細胞接着に必要なECMは形成されない。

【０００５】従って、NIPAM上で培養した単層の細胞層同士を重層し、細胞層を34℃以下の条件下でNIPAMを可溶化して取り除き、細胞同士が直接接するように重ねても、上部に重ねた細胞は、増殖するための足場が十分でなく、従って安定した増殖は望むことができなかった。

【０００６】また、液状化したNIPAMが細胞毒として作用するため細胞の正常な成長を阻害する現象も認められるため、細胞の階層化の手段としては極めて不向きで不安定な技術であった。これまでに各種ゲル上に細胞外マトリックス成分を重層化しゲル化させた培地での細胞培養は成功例がなく、重層後に不要となったゲルを容易に除去できるような培地を使用した培養系確立の試みが続けられていた。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、可溶化した際に細胞の成長・増殖を阻害するNIPAMを使用することなく安定的かつ容易に細胞を重層する技術、及び細胞層を重層した場合に上層部の細胞と下層部の細胞とを細胞外マトリックス成分（例えばコラーゲン）を介した状態で接着することができる技術を提供し、これにより、皮膚などの一部組織を除きin vitro条件下では困難とされてきた細胞の階層化技術に道を開くことを目的とする。

【０００８】

【課題を解決するための手段】アルギン酸は、グルロン酸（Ｇ）とマンヌロン酸（Ｍ）よりなるブロック共重合体であり、グルロン酸が多価金属イオン（例えばカルシウムイオン）をとりかこむような形でエッグボックスを形成し、アルギン酸ゲルが形成される（図１参照）。そして、Ｇ／Ｍの比が高い方がアルギン酸のゲル形成能が大きい。しかし、アルギン酸ゲルは100℃以上でも融解しないため、アルギン酸ゲルから生細胞を剥離する方法として、NIPAMのような温度感受性を利用する方法は極めて不適当である。一方、アルギン酸ゲルはキレート化剤（例えばEDTA）に浸すと、容易に溶解し液状化する。また、アルギン酸ゲルは海草由来の天然物で生分解性の性質を有するため、溶解した際にアルギン酸ゲルが十分除去されなかった場合においても細胞の正常な成育を阻害しない。

【０００９】本発明者らは、アルギン酸ゲルの上記性質に着目し鋭意研究を重ねた結果、多孔質膜にアルギン酸ゲル層（例えば、アルギン酸カルシウムゲル層）を重層化した細胞培養担体を用いて細胞を培養し、得られる細胞培養物のアルギン酸ゲル層を可溶化すれば、細胞層を含む細胞培養物を容易に脱離できるとともに、この可溶化した細胞培養物を用いれば、細胞層を容易に重層化できることを見出した。

【００１０】また、本発明者らは、細胞培養担体を用いて培養する細胞の種類によっては、多孔質膜に重層化したアルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分ゲル層（例えば、コラーゲンゲル層）又は細胞外マトリックス成分スポンジ層（例えば、コラーゲンスポンジ層）をさらに重層化した細胞培養担体を用いることにより、細胞の培養をより効率よく行なうことができることを見出した。以上の知見に基づいて、本発明は完成されるに至った。

【００１１】すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

（１）多孔質膜と該多孔質膜上に形成されたアルギン酸ゲル層とを含み、シート状を呈することを特徴とする、細胞培養担体。

（２）前記アルギン酸ゲルがアルギン酸カルシウムゲルであることを特徴とする前記（１）記載の細胞培養担体。

（３）前記アルギン酸ゲル層上に形成された細胞外マトリックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層をさらに含むことを特徴とする、前記（１）又は（２）の細胞培養担体。

（４）前記細胞外マトリックス成分がコラーゲンであることを特徴とする、前記（３）記載の細胞培養担体。

【００１２】

（５）前記（１）～（４）のいずれかに記載の細胞培養

担体を用いて細胞を培養することを特徴とする、細胞の培養方法。

（６）前記（１）～（４）のいずれかに記載の細胞培養担体上に細胞層を形成してなる細胞培養物を、アルギン酸ゲル層を可溶化処理して前記多孔質膜と細胞層とを剥離し、その後、剥離した細胞層を、前記（１）～（４）のいずれかに記載の細胞培養担体上に細胞層を形成してなる細胞培養物上に重層する細胞の重層化方法。

（７）前記（６）記載の細胞の重層化方法により得られる重層化した細胞層。

【００１３】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の細胞培養担体は、多孔質膜と該多孔質膜上に重層化されたアルギン酸ゲル層とを含むことを特徴とする。「細胞培養担体」とは、細胞を培養する際の担体又は支持体となり得るものを意味する。

【００１４】「多孔質膜」とは、アルギン酸ゲルは透過させないが、キレート化剤は透過させ得る膜を意味する。「多孔質膜」は、アルギン酸ゲルは透過させないが、キレート化剤は透過させ得る膜である限り特に限定されず、細孔を有する膜以外に、空隙を有する膜や、細孔と空隙の両方を有する膜等も含まれる。多孔質膜の具体例としては、濾紙、限外濾過膜、シリコーンゴム膜、四フッ化エチレン樹脂多孔質膜（ＰＴＦＥ多孔質膜）、不織布、ガーゼ様メッシュ、各種メンブレンフィルター等を例示でき、好ましいものとしては、限界濾過膜、親水性ＰＴＦＥ多孔質膜を例示できる。多孔質膜が細孔を有するものである場合、細孔の大きさはアルギン酸ゲルは透過させないが、キレート化剤は透過させ得る大きさである限り特に限定されないが、通常は0.02～1000μｍであり、好ましくは0.02～100μｍであり、さらに好ましくは0.1～10μｍである。

【００１５】「アルギン酸ゲル」とは、アルギン酸の分子中のカルボン酸基と多価金属イオンとがキレート構造を形成してゲル化したものを意味し、「アルギン酸ゲル層」とは、層状のアルギン酸ゲルを意味する。アルギン酸は、グルクロン酸（Ｇ）とマンヌロン酸（Ｍ）よりなるブロック共重合体であり、Ｍブロックが有するポケット構造に多価金属イオンが侵入してエッグボックスを形成し、ゲル化すると考えられている（図１参照）。アルギン酸のゲル化を引き起こし得る多価金属イオンの具体例としては、バリウム（Ba）、鉛（Pb）、銅（Cu）、ストロンチウム（Sr）、カドミウム（Cd）、カルシウム（Ca）、亜鉛（Zn）、ニッケル（Ni）、コバルト（Co）、マンガン（Mn）、鉄（Fe）、マグネシウム（Mg）等の金属イオンを例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオンを例示できる。アルギン酸のゲル化は、常法に従って行なうことができる。アルギン酸のゲル化は、例えばイオン交換を利用して行なうことができる。例えば、アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを添加すると速やかにイオン交換が生じ、アルギン酸カルシウムゲルが得られる。より具体的には、0.2～２％アルギン酸ナトリウム水溶液を、底が多孔質膜（例えば、FALCON社製ポアサイズ3.0ミクロンのメンブラン）になったセルに0.3～0.5ml添加した後、0.01～0.1M $CaCl_2$水溶液を多孔質膜からしみこませ、20～30℃で0.5～１時間放置することによりアルギン酸カルシウムゲル層が得られる。このように多孔質膜を用いてアルギン酸のゲル化を行なえば、多孔質膜と該多孔質膜に重層化されたアルギン酸ゲル層とを含む細胞培養担体を得ることができる。但し、本発明において、アルギン酸のゲル化を多孔質膜を用いて行なうことは必須ではなく、別途作製したアルギン酸ゲルを多孔質膜上に設置することにより、本発明の細胞培養担体を作製してもよい。

【００１６】アルギン酸は、褐藻類の細胞壁構成多糖又は細胞間充填物質として天然に存在しており、これらを原料として採取可能である。原料褐藻類の具体例としては、ヒバマタ目ダービリア科ダービリア属（例えばD.potatorum）、ヒバマタ目ヒバマタ科アスコフィラム属（例えばA.nodosum）、コンブ目コンブ科コンブ属（例えばマコンブ、ナガコンブ）、コンブ目コンブ科アラメ属（例えばアラメ）、コンブ目コンブ科カジメ属（例えばカジメ、ウロメ）、コンブ目レッソニア科レッソニア属（例えばL.flavikans）の褐藻類を例示できる。また、市販のアルギン酸を使用することもできる。アルギン酸のＧ／Ｍの比は特に限定されないが、Ｇ／Ｍの比が大きい方がゲル形成能が大きいので、Ｇ／Ｍの比は大きい方が好ましく、具体的には0.1～１であるのが好ましく、0.2～0.5であるのがさらに好ましい。

【００１７】本発明の細胞培養担体は、多孔質膜と該多孔質膜上に重層化されたアルギン酸ゲル層とを含む限り、いかなる構成をとってもよい。本発明の細胞培養担体は、例えば、アルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層がさらに重層化された構成をとることができる。本発明の細胞培養担体を用いて培養する細胞が、アルギン酸ゲル層よりも細胞外マトリックス成分ゲル層又はスポンジ層の方が増殖・発育しやすい細胞である場合（例えば、繊維芽細胞）には、アルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分ゲル層又はスポンジ層を重層化させるのが好ましい。

【００１８】「細胞外マトリックス成分ゲル」とは、細胞外マトリックス成分がゲル化したものを意味し、「細胞外マトリックス成分ゲル層」とは、層状の細胞外マトリックス成分ゲルを意味する。細胞外マトリックスは、一般的には「動物組織中の細胞の外側に存在する安定な生体構造物で、細胞が合成し、細胞外に分泌・蓄積した生体高分子の複雑な会合体」と定義されており（生化学

辞典（第３版）p.570,東京化学同人（株））、細胞を物質的に支持する役割や細胞の活性を調節する役割（すなわち細胞外の情報を細胞に伝えその活性に変化を与える役割）等を担っている。「細胞外マトリックス成分」とは、細胞外マトリックスの構成成分を意味し、その具体例としては、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等を例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、コラーゲン、マトリゲル（IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸よりなるゲル）を例示できる。細胞外マトリックス成分は、常法に従って得ることができる。また、市販の細胞外マトリックス成分を使用してもよい。細胞外マトリックス成分のゲル化は、常法に従って行なうことができる。例えば、細胞外マトリックス成分がコラーゲンである場合には、0.3～0.5%コラーゲン水溶液を37℃で10～20分間インキュベーションすることにより、コラーゲンゲルを得ることができる。細胞外マトリックス成分のゲル化の際には、必要に応じてゲル化剤を使用してもよい。

【００１９】「細胞外マトリックス成分スポンジ」とは、細胞外マトリックス成分が多孔質のスポンジ状に３次元的に加工されたものを意味し、「細胞外マトリックス成分スポンジ層」とは、層状の細胞外マトリックス成分スポンジを意味する。細胞外マトリックス成分スポンジはそれ自体が３次元的な構造をしているため、細胞外マトリックス成分スポンジ層を用いれば階層的な細胞培養を行うことが可能である。また、細胞外マトリックス成分スポンジ層の内腔に各種細胞増殖因子や増殖因子を内包したリポソームなどを含浸させることにより細胞外マトリックス成分スポンジ層内の細胞を自由に分化を誘導させることが可能となる。細胞外マトリックス成分としては、上記と同様のものを例示できる。細胞外マトリックス成分スポンジは常法に従って作製することができる。また、市販の細胞外マトリックス成分スポンジを使用してもよい。

【００２０】アルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分ゲル層を重層化する際には、アルギン酸ゲル層と細胞外マトリックス成分ゲル層とを別々に作製した後、両者を重層化してもよいが、アルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分含有水溶液を重層化した後、該水溶液をゲル化させるのが好ましい。細胞外マトリックス成分ゲル層は脱着を行なうのに十分な物理的強度を有していないため、細胞外マトリックス成分ゲル層を形成させた容器（例えばディッシュ、シャーレ等）から細胞外マトリックス成分ゲル層を剥離するのは困難だからである。

【００２１】アルギン酸ゲル層上に細胞外マトリックス成分スポンジ層を重層化する際には、アルギン酸ゲル層と細胞外マトリックス成分スポンジ層とを別々に作製した後、両者を重層化すればよい。

【００２２】本発明の細胞培養担体を構成する多孔質膜、アルギン酸ゲル層、細胞外マトリックス成分ゲル層等の厚さは特に限定されないが、多孔質膜の厚さは通常0.01～１ｍｍ、好ましくは0.01～0.1ｍｍ、さらに好ましくは0.05～0.1ｍｍであり、アルギン酸ゲル層の厚さは通常0.1～３ｍｍ、好ましくは１～２ｍｍ、さらに好ましくは１ｍｍであり、細胞外マトリックス成分ゲル層の厚さは通常0.1～１ｍｍ、好ましくは0.2～0.5ｍｍ、さらに好ましくは0.4ｍｍであり、細胞外マトリックス成分スポンジ層の厚さは通常0.1～２ｍｍ、好ましくは0.2～１ｍｍ、さらに好ましくは0.5ｍｍである。本発明の細胞培養担体の大きさは、培養する細胞の数等に応じて適宜決定することができ、メス等を用いて適当な大きさに成形することもできる。

【００２３】本発明の細胞培養担体は、細胞の培養に用いることができる。細胞の培養は、例えば、アルギン酸ゲル層上、細胞外マトリックス成分ゲル層上、細胞外マトリックス成分スポンジ層上又は細胞外マトリックス成分スポンジ層中で行なうことができる。本発明の細胞培養担体として、多孔質膜と該多孔質膜上に重層化されたアルギン酸ゲル層とから構成される細胞培養担体を用いる場合には、アルギン酸ゲル層上で細胞の培養を行なうことができる。本発明の細胞培養担体として、アルギン酸ゲル層上に重層化された細胞外マトリックス成分ゲル層をさらに含む細胞培養担体を用いる場合には、細胞外マトリックス成分ゲル層上で細胞の培養を行なうことができる。本発明の細胞培養担体として、アルギン酸ゲル層上に重層化された細胞外マトリックス成分スポンジ層をさらに含む細胞培養担体を用いる場合には、細胞外マトリックス成分スポンジ層上又は細胞外マトリックス成分スポンジ層中で細胞の培養を行なうことができる。培養し得る細胞の具体例としては、繊維芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、肝細胞、小腸上皮細胞、表皮角化細胞、骨芽細胞、骨髄間葉細胞等を例示でき、好ましいものとしては繊維芽細胞を例示できる。細胞の培養の際には、通常、細胞濃度１～1.5万cells/mlの培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）をアルギン酸ゲル層、細胞外マトリックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層上に添加する。細胞の培養条件は、培養する細胞に従って適宜選択し得る。アルギン酸ゲル層上又は細胞外マトリックス成分ゲル層上で細胞を培養する場合には、通常、アルギン酸ゲル層上又は細胞外マトリックス成分ゲル層上にコンフルエントな単層の細胞層が形成されるまで行なう。

【００２４】本発明の細胞培養担体を用いた細胞の培養は具体的には次のようにして行なうことができる。細胞培養担体をシャーレ等の内部に設置し、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加して12～24時間放置し、培養液を細胞培養担体中に浸潤させる。シャーレ内の培養液を捨て、細胞培養担体のアルギン酸ゲル層、細胞外マトリ

ックス成分ゲル層又は細胞外マトリックス成分スポンジ層上に細胞を播き、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加する。37℃で１～２時間放置し、細胞をアルギン酸ゲル層、細胞外マトリックス成分ゲル層又はスポンジ層に保持（接着）させた後、37℃で培養を続ける。培養の際には、必要に応じて培養液を交換してもよい。通常は培養0.5～２日ごとに培養液を交換する。

【００２５】本発明の細胞培養担体を用いた細胞の培養により得られる細胞培養物は、本発明の細胞培養担体と該細胞培養担体に保持された細胞層とを含む。「細胞培養担体に保持された細胞層」には、アルギン酸ゲル層上に形成された細胞層、細胞外マトリックス成分ゲル層上に形成された細胞層、細胞外マトリックス成分スポンジ層上に形成された細胞層、及び細胞外マトリックス成分スポンジ層中に形成された細胞層のいずれか１種又はこれらの組み合わせが含まれる。本発明の細胞培養担体として多孔質膜と該多孔質膜に重層化されたアルギン酸ゲル層とから構成される細胞培養担体を用いる場合には、アルギン酸ゲル層上に形成された細胞層が、本発明の細胞培養担体としてアルギン酸ゲル層上に重層化された細胞外マトリックス成分ゲル層をさらに含む細胞培養担体を用いる場合には、細胞外マトリックス成分ゲル層上に形成された細胞層が、本発明の細胞培養担体としてアルギン酸ゲル層上に重層化された細胞外マトリックス成分スポンジ層をさらに含む細胞培養担体を用いる場合には、細胞外マトリックス成分スポンジ層中及び／又は細胞外マトリックス成分スポンジ層上に形成された細胞層が、それぞれ「細胞培養担体に保持された細胞層」に該当する。

【００２６】細胞培養物は、アルギン酸ゲル層を可溶化処理することにより多孔質膜から脱離させることができる。アルギン酸ゲル層の可溶化処理は、キレート化剤を使用して行なうことができる。キレート化剤の具体例としては、EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)、EGTA(Ethylene Glycol-bis(β-aminoethyl Ether))等のポリアミノカルボン酸類、クエン酸等のオキシカルボン酸類等を例示でき、これらのうち特に好ましいものとしてはEDTA、EGTAを例示できる。キレート化剤は、アルギン酸の分子中のカルボン酸基とキレート構造を形成している多価金属イオンの種類に応じて適宜選択できる。例えば、アルギン酸カルシウムゲルの場合には、EDTAを用いることができ、この場合のキレート化剤の濃度は通常0.01～１M、好ましくは0.05～0.2Mとする。キレート化剤を用いたアルギン酸ゲル層の可溶化処理は、多孔質膜からキレート化剤をしみこませて行なうのが好ましい。これによって、多孔質膜とアルギン酸ゲル層とを容易に分離することができ、細胞培養物を多孔質膜から容易に脱離させることができる。アルギン酸ゲル層の可溶化処理によってアルギン酸ゲル層を完全に除去する必要はなく、可溶化されなかったアルギン酸ゲル層が残っていてもよいが、アルギン酸ゲル層はできるだけ可溶化して除去するのが好ましい。

【００２７】アルギン酸ゲル層を可溶化処理して得られる細胞培養物は、細胞層を含んでいるので、細胞層の重層化に使用できる。細胞層の重層化の際には、アルギン酸ゲル層を可溶化して得られる細胞培養物同士を重層化してもよいし、アルギン酸ゲル層を可溶化して得られる細胞培養物を別に作製した細胞層に重層化してもよい。重層化する細胞層の細胞の種類は、同一であっても異なっていてもよい。重層化する細胞層の数は特に限定されないが、通常１～10、好ましくは１～５、さらに好ましくは１～３である。

【００２８】重層化により得られる重層化された細胞層は、アルギン酸ゲル層上に形成された細胞層、細胞外マトリックス成分ゲル層上に形成された細胞層、細胞外マトリックス成分スポンジ層上に形成された細胞層、及び細胞外マトリックス成分スポンジ層中に形成された細胞層のいずれか１種又はこれらの組み合わせを含む。

【００２９】重層化する細胞層として、例えば、小腸上皮細胞層、筋肉層及び繊維芽細胞層を使用すれば、小腸壁の３次元組織構造物を構築できる。この３次元組織構造物は、in vitroにおける薬物の透過性試験へ適用できるとともに、動物実験代替モデルや移植用臓器へ応用できる。重層化した細胞層は、細胞層を構成する細胞の種類に応じた培養条件で培養することができる。培養の際には、例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地等の培地を使用できる。

【００３０】

【実施例】〔実施例１〕細胞培養担体の作製

細胞培養担体の作製の手順を図１に示す。具体的には次のようにして細胞培養担体を作製した。

（１）1%アルギン酸ナトリウム水溶液を、底が3.0μmの多孔質膜（FALCON社製ポアサイズ3.0ミクロンのメンブレン）になったセルに1ml添加した。底部の多孔質膜は水分子や比較的小型の分子は通過するが、培養細胞等巨大な分子やゲル化した高分子化合物等は透過させない。

（２）セル底部の多孔質膜から0.1M $CaCl_2$ をしみこませ、室温で１時間放置し、ゲル化させた。これにより、多孔質膜と該多孔質膜上に重層化されたアルギン酸カルシウムゲル層とを含む細胞培養担体が得られた。

（３）D-MEM培地（入手先Sigma）で3%に希釈したコラーゲン水溶液（コラーゲンのタイプ：I-Ac　入手先：高研）0.5mlを、アルギン酸カルシウムゲル層上に添加し、コラーゲン水溶液の薄層を作製した後、CO_2 インキュベーターを用いて37℃で約20分間インキュベーションし、コラーゲン水溶液をゲル化させた。これにより、アルギン酸カルシウムゲル層上にコラーゲンゲル層が重層化された細胞培養担体が得られた。

11

【００３１】〔実施例２〕細胞培養担体を用いた細胞の培養

細胞培養担体を用いた細胞の培養の手順を図２に示す。具体的には次のようにして細胞培養担体を用いた細胞の培養を行なった。

（１）実施例１で作製した細胞培養担体をセルごとシャーレ内に設置した後、D-MEM培地をセル内に2ml、シャーレに3ml添加して一晩放置し、D-MEM培地を細胞培養担体中に浸潤させた。

（２）予め培養しておいた繊維芽細胞をトリプシン処理で回収し、細胞濃度を20000cell/mlに調製した。セル及びシャーレ内の培地を捨てた後、この繊維芽細胞液0.5ml（細胞数10000cell）をコラーゲンゲル層上に添加し、シャーレ内にD-MEM培地3mlを添加した。

（３）CO_2インキュベーターを用いて37℃で約１時間インキュベーションし、繊維芽細胞をコラーゲンゲル層上に接着、保持させた。

（４）培養2日目に培地を新しいものと交換し、さらに1日培養することにより、コンフルエントな単層の細胞層が形成された。これによって、多孔質膜、該多孔質膜上に重層化されたアルギン酸カルシウムゲル層、該アルギン酸カルシウムゲル層上に重層化されたコラーゲンゲル層、及び該コラーゲンゲル層上に形成された繊維芽細胞層を含む細胞培養物が得られた（図２参照）。

【００３２】〔実施例３〕細胞層の重層化

12

＊細胞層の重層化の手順を図３に示す。具体的には次のようにして細胞層の重層化を行なった。

（１）実施例２で得られた細胞培養物をセルごと0.1M EDTA溶液に浸し、多孔質膜を通じてEDTAを透過させ、アルギン酸カルシウムゲルを溶解した。これによって、繊維芽細胞層を含む細胞培養物を多孔質膜から脱離させることができた。

（２）セル内の余分な水分を吸い取り、セル内壁からメスをいれ、多孔質膜をくりぬき、繊維芽細胞層を含む細胞培養物をD-MEM培地中に浮遊させた。

（３）この繊維芽細胞を含む細胞培養物を、実施例２と同様の方法で得られた別の細胞培養物に重層化した。同様の操作を繰り返し、重層化した細胞層（３層）が得られた。

（４）重層化した細胞層は、D-MEM培地で培養できることを確認した。

【００３３】

【発明の効果】本発明により、細胞層の重層化を容易に行なうことができる細胞培養担体が提供される。

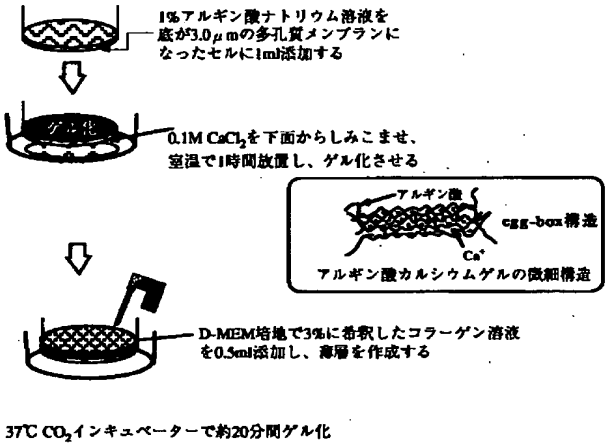
【図面の簡単な説明】

【図１】細胞培養担体の作製手順を示す図である。

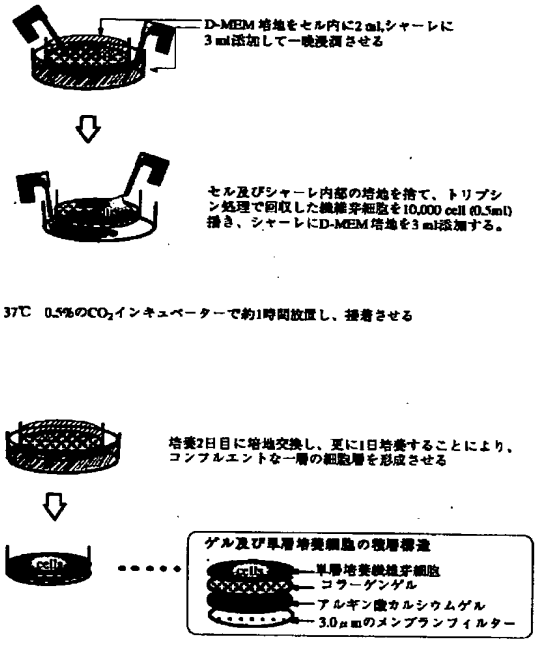
【図２】細胞培養担体を用いた細胞の培養手順を示す図である。

【図３】細胞層の重層化手順を示す図である。

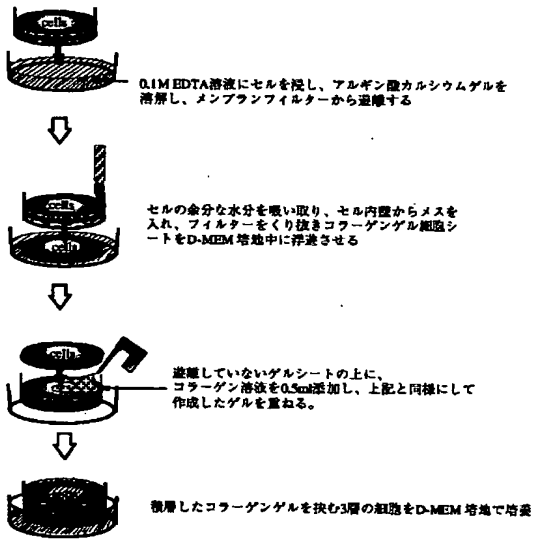
【図１】



【図２】



【図３】



フロントページの続き

(56)参考文献　特開　平５－81（ＪＰ，Ａ）
特開　平５－260959（ＪＰ，Ａ）
特開　平５－252952（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷，ＤＢ名)
C12N　11/10